

東洋大学学術情報リポジトリ Toyo University Repository for Academic Resources

光学異性体を認識し選択的にイオン化させるMALDI法の開発

著者	許 家?
著者別名	Jiawei XU
雑誌名	工業技術
巻	41
ページ	70-73
発行年	2019-02
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00010948/

光学異性体を認識し選択的にイオン化させる MALDI 法の開発

Chirality and analyte structure-selective MALDI

許 家瑋*

1. はじめに

光学異性体を扱う重要性は、薬物、農業、食物といった様々な分野において増加してきている。それは光学異性体が生体に対し異なる作用を示すからである。例えば、人体は L グルタミン酸に対し旨味を感じるが、D グルタミン酸には感じない。また L イブプロフェンは鎮痛剤としての薬効があるが、D イブプロフェンには無い。つまり一方の光学異性体は薬効を持つが、他の光学異性体は持たない、または非常に弱い薬効を持つに留まる。さらに L 体と D 体を等量含むラセミ体では、L 体のみの薬効に比べて効果が減少するといったことも知られている。このため、光学異性体を合成し、分離し、そして検出する方法の開発が極めて重要となってくる。

質量分析法は、光学異性体の検出に対し高いポテンシャルを持つことが知られている。ガスクロマトグラフィー¹⁾や液体クロマトグラフィー²⁾といった分離手法と組み合わせることで、光学異性体の分離検出が可能になる。マトリクス支援レーザー脱離イオン化法は脱離イオン化の際に試料分子を壊さない「ソフトイオン化」が行える手法であり、このため分子量による試料分子の検出が可能になる³⁾。MALDI 法においては、試料に夾雑物が多量に含まれている場合においても分離作業を行わずに試料分子の検出が可能になる場合がある。しかしながら、試料分子の質量を測定する質量分析法では当然のことではあるが、同じ質量を持ち異なる分子構造を持った分子は分離して検出することができない。近年のイオンモビリティ法の出現によって、構造が大きく異なる分子に関しては分離計測を行うことが可能になってきた⁴⁾。しかしながら、究極的な構造異性体である光学異性体の MALDI 法による分離計測は現在でも全く不可能である。

MALDI 法においては、使用するマトリクスが試料の

イオン化及び脱離に関して重要な役割を果たしている。このため、試料分子に対しイオン化と脱離能力を提供できるのであれば、有機酸や金属・半導体ナノ粒子⁵⁾といった通常用いられるマトリクスだけでなく、ある機能性を持った分子集合体も MALDI 用のマトリクスとして利用できるのではないかと考えた。この解説では、我々が新しく開発した光学異性体の分子構造を認識して分離し、脱離イオン化させるマトリクスについて紹介する⁶⁾。さらにこの手法を同じ分子量を持ち異なる構造を持つ三糖の分離計測に応用したのでこちらも報告する⁶⁾。

2. 実験

2,4,6 トリヒドロキシアセトフェノン(THAP)と L アラニン(L-Ala)を乳鉢で混合し、温度応答性高分子水溶液に溶かした。得られた溶液に対し透析を行った。糖の検出には活性炭、THAP、ラフィノース(Raf)を乳鉢で混合し、同じく高分子水溶液に溶かした。得られた溶液に対し透析を行い、MALDI 用のマトリクスを得た。濃度 1 mg/mL の試料溶液をステンレス基板上に滴下し、作成したマトリクス溶液を続いて滴下した。溶媒を揮発させた後、ブルカー社製 MALDI 装置でイオンを観測した。

3. 結果と考察

3. 1 マトリクスの概要

温度応答性高分子とは、温度によりコイル・グロービュル相転移を起こす高分子である。下限臨界溶液温度(LCST)以下では、溶媒の水と水素結合を形成し、コイルのような状態で溶媒中に溶ける。一方、温度が LCST 以上になると水素結合に比べ分子の運動が激しくなり、高分子同士がグロービュルを形成し始める。図 1 に今回

*理工学部 応用化学科

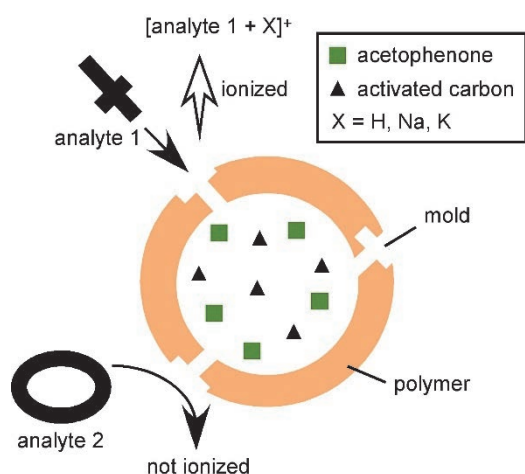


図 1. 開発したマトリックスの概念図

作成した光学異性体認識マトリックスの概念図を示した。まず、温度応答性高分子と THAP、L-Ala の溶液を作成し、その温度を上げることで高分子は THAP と L-Ala を内包しながらグロービュル構造を作る。その際、THAP は疎水性が強い分子のため、高分子の内側に存在すると考えられる。その一方、L-Ala は親水性の高い分子であるため、高分子の外側に存在すると考えられる。そこで透析を行うと、親水性の高い L-Ala が自身の分子構造を鋳型として残しながら流れ出すことになる。この様な状態の高分子に例えば D-Ala が出会うと、D-Ala は L-Ala が作った鍵穴に入ることができず、結果的に高分子中央に位置する THAP と出会うことが出来ずにイオン化されない。一方、高分子が L-Ala に出会うと L-Ala は鍵穴に入ることができ、結果的にイオン化されることになる。

3. 2 レーザー脱離イオン化質量スペクトル

図 2 に L-Ala で鋳型を作ったマトリックスを使ったレーザー脱離イオン化質量スペクトルの結果を示した。まず測定試料を加えず、マトリックスのみでスペクトルを観測した場合の結果を図 2(a) に示した。図からも分かるようにピークは観測されず、このため鋳型作成に利用した L-Ala は透析により完全に除かれていることが分かった。次に試料を D-Ala にして測定をした結果を図 2(b) に示した。質量電荷比 $m/z = 112.1$ の場所にわずかな盛

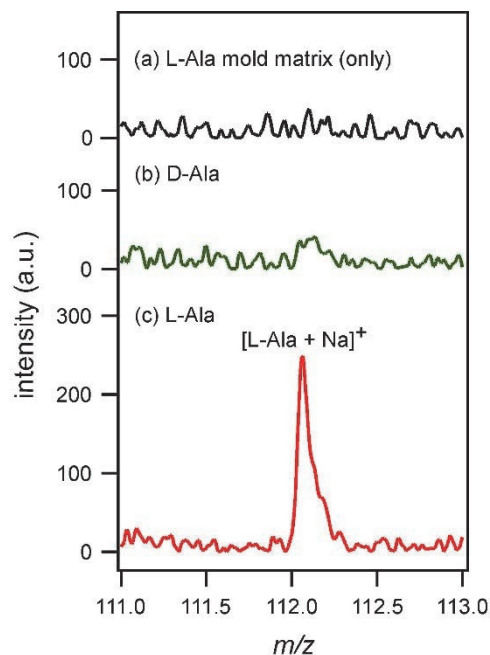


図 2. L-Ala で鋳型を作ったマトリックスによるレーザー脱離イオン化質量スペクトル

り上がりが見えるが、信号とノイズの比(S/N 比)が 3 以下であるため、分析化学的には検出限界(limit of detection; LOD)以下と見なされる。このため、このスペクトル上の盛り上がりはピークとは認識されない。その一方、L-Ala を試料として測定したところ、 $m/z = 112.1$ の場所に L-Ala の Na^+ 付加体($[\text{L-Ala} + \text{Na}]^+$)のピークが観測された。以上から D-Ala ではなく L-Ala のみに応答する、つまり光学異性体に対し選択的なイオン化を実現できるマトリックスが開発できた。

3. 3 D-, L-体混合物からの測定

開発したマトリックスの有用性をさらに確かめるために次に D-Ala を鋳型分子としたマトリックスを作成し、D-Ala と L-Ala の混合溶液を試料として用いた。試料である混合溶液の濃度は、D- (mg/mL) : L- (mg/mL) = 1:0, 0.5:0.5, 0.25:0.75, 0:1 と変化させ、両者の合計が 1mg/mL となるように固定した。その時に得られた結果を Table 1 にまとめて記した。マトリックスの作成には、質量比で THAP : D-Ala = 4 mg/mL : 0.5 mg/mL となるように溶液を調製している。このため高分子表面上に

sample D-Ala : L-Ala	peak intensity (a.u.)					SD (a.u.)	RSD (%)	
	#1	#2	#3	#4	#5		intra	overall
1.00 : 0.00	314	378	322	396	316	345.2	38.80	11.24
0.50 : 0.50	338	343	360	319	370	346.0	19.87	5.73
0.25 : 0.75	185	162	163	149	190	169.8	17.17	10.11
0.00 : 1.00	47	66	40	67	62	56.4	10.11	21.59

Table1. $[\text{D-Ala}+\text{Na}]^+$ ($m/z = 112.1$) のピーク強度と再現性

は 0.5 mg/mL の D-Ala で一杯になるだけの鍵穴が作成される。Table 1 を見ると、試料の比率 1:0 と 0.5:0.5 においては (D-Ala の濃度は 1mg/mL と 0.5mg/mL)、ほぼ同じ強度のピークが質量電荷比 $m/z = 112.1$ に観測されたことが分かる。これは試料としての D-Ala がはまることのできる鍵穴が 0.5mg/mL 分しかないため、それ以上の D-Ala 分子がイオン化されないためであると理解できる。

その一方、比率 0.25:0.75 の試料を用いると、質量電荷比 $m/z = 112.1$ のピーク強度は半分になった。これは試料としての D-Ala の分子数が半分になったためである。さらに比率 0:1 の試料では S/N 比 3 以下(N=31)の信号しか得られなかったことから、作成したマトリクスは L-Ala には応答せず、D-Ala にのみマトリクスとして働き、D-Ala の濃度に応じたピーク強度変化を示したことが理解された。このことから、質量電荷比 $m/z = 112.1$ のピークは $[\text{D-Ala}+\text{Na}]^+$ によるものであることが理解され、開発したマトリクスは特定の光学異性体のみ脱離イオン化能を持つことが確認された。Table 1 の結果から、検出限界(LOD)は 1.58 nmol と求めることができ、再現性 (相対標準偏差; RSD) は 12.17% となった。この再現性は一般のマトリクスを用いた時の値に比べて格段に向上しており、このことから高分子表面上に分子鑄型がほぼ均一に作成されていることが示唆された。

ラフィノース(Raf)とマルトトリオース(Mal)は三糖であり、全く同じ分子量を持つが構造の異なる分子である。今回は Raf で鑄型を作ったマトリクスを作成した。今回のマトリクス作成には糖の吸着材として活性炭素を THAP とともに使用した。図 3(a)に試料なしの状態で測定した質量スペクトルを示した。スペクトル上に糖由来のピークが確認できないことから、鑄型作成に利用した Raf は透析により完全に取り除かれていることが理解された。次に Mal を試料として測定した際に得られたスペクトルを図 3(b)に示した。二糖のピークが観測されたものの、Mal 由来のピークは観測されなかった。さらに Raf を試料として測定した結果を図 3(c)に示した。この場合のみ、Raf の Na⁺及び K⁺付加体のピーク

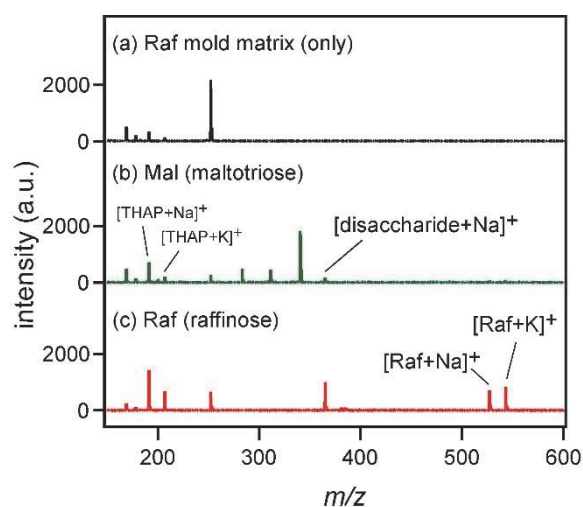


図 3. Raf で鑄型を作ったマトリクスによるレーザー脱離イオン化質量スペクトル

3. 4 構造の異なる三糖の検出

が $m/z=527.4$ と 543.4 に観測された。このことから、開発したマトリクスは構造異性体を分離してイオン化させる能力があることが証明された。

4. まとめ

光学異性体を含めた分子量が等しく構造が異なる分子の選択的レーザー脱離イオン化を実現するマトリクスを開発した。温度応答性高分子上に試料分子の鋳型を作る方法で、D-, L-Ala や三糖の分子構造選択的イオン化が可能になった。

参考文献

- 1) D. Hensley, J. T. Cody, *J. Anal. Toxicol.* **23**, 518 (1999).
- 2) W. Naidong, P. R. Ring, C. Midtlien, X. Jiang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25**, 219 (2001).
- 3) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 4) E. Stone, K. J. Gillig, B. Ruotolo, K. Fuhrer, M. Gonin, A. Schultz, D. H. Russell, *Anal. Chem.*, **73**, 2233 (2001).
- 5) M. Sakurai, T. Sato, J. Xu, S. Sato, T. Fujino, *Appl. Sci.* **8** 492 (2018).
- 6) Y. Fujii, J. Xu, T. Fujino, *Sci. Rep.* **8**, 13138 (2018).